

New stable D-N-alpha-carbamylase mutants - having a substitution of cysteine at position 243, 250 or 279 with a different natural amino acid

Patent Assignee: ENIRICERCHE SPA

Inventors: GIULIANO G; GUIDO G; RENATA G; GALLI G; GRANDI G; GRIFANTINI R

Patent Family

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
<u>EP 677584</u>	A1	19951018	EP 95103572	A	19950313	199548	B
JP 8084584	A	19960402	JP 9591195	A	19950417	199623	
<u>EP 677584</u>	B1	19961211	EP 95103572	A	19950313	199703	
DE 69500108	E	19970123	DE 95600108	A	19950313	199709	
			EP 95103572	A	19950313		
ES 2096494	T3	19970301	EP 95103572	A	19950313	199716	
IT 1269321	B	19970326	IT 94MI725	A	19940415	199742	
<u>US 5807710</u>	A	19980915	US 95415343	A	19950403	199844	
			US 97900711	A	19970725		
<u>US 5869298</u>	A	19990209	US 95415343	A	19950403	199913	
JP 3701341	B2	20050928	JP 9591195	A	19950417	200566	

Priority Applications (Number Kind Date): IT 94MI725 A (19940415)

Cited Patents: EP 281822; EP 610517; WO 9400577; WO 9403613

Patent Details

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
<u>EP 677584</u>	A1	E	14	C12N-015/55	
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE LI NL PT SE					
JP 8084584	A		9	C12N-009/14	

EP 677584	B1	E	16	C12N-015/55	
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE LI NL PT SE					
DE 69500108	E			C12N-015/55	Based on patent EP 677584
ES 2096494	T3			C12N-015/55	Based on patent EP 677584
IT 1269321	B			C12K-000/00	
US 5807710	A		10	C12P-021/06	Div-ex application US 95415343
US 5869298	A			C12P-013/04	
JP 3701341	B2		14	C12N-009/14	Previous Publ. patent JP 8084584

Abstract:

EP 677584 A

Stable mutants of D-N- alpha -carbamylase (DNC) are claimed, characterised in that at least one of the Cys residues at position 243, 250 and 279 of the wild-type DNC amino acid sequence is substd. with a different residue selected from natural amino acids.

USE - The mutant DNC is used for the prodn. of D- alpha amino acids (DAA's) for use in the prodn. of e. g. penicillins, cephalosporins, pesticides or sweeteners.

ADVANTAGE - The mutant DNC has improved stability and provides improved prodn. yields of DAA's.

Dwg.0/2

EP 677584 B

Stable mutants of D-N-alpha-carbamylase of Agrobacterium radiobacter characterised in that, at least one of the Cysteine amino acid residues in position 243, 250 and 279 of the amino acid sequence of wild type D-N-alpha-carbamylase is substituted with a different residue selected from the group of natural amino acids.

(Dwg.0/2)

Derwent World Patents Index

© 2005 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 10466292

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-84584

(43)公開日 平成8年(1996)4月2日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/14				
C 0 7 H 21/04	B			
C 0 7 K 14/195		8318-4H		
		9281-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	ZNA A
			(C 1 2 N 15/ 00	ZNA A
審査請求 未請求 請求項の数22 OL (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平7-91195	(71)出願人	595061439 エニリチエルケ、ソシエタ、ベル、アチオニ ENIRICERCHE S. P. A. イタリア国ミラノ、サン、ドナート、ミラネーゼ、ピア、マリターノ、26
(22)出願日	平成7年(1995)4月17日	(72)発明者	ジュリアーノ、ガルリ イタリア国サン、ドナート、ミラネーゼ、ピア、フェランディーナ、14/アー
(31)優先権主張番号	MI 9 4 A 0 0 0 7 2 5	(72)発明者	レナータ、グリファンティーニ イタリア国ミラノ、ピア、ピエトロ、コレッタ、14
(32)優先日	1994年4月15日	(74)代理人	弁理士 佐藤 一雄 (外2名) 最終頁に続く
(33)優先権主張国	イタリア (I T)		

(54)【発明の名称】 D - N - α - カルバミラーゼの安定な変異体

(57)【要約】

【構成】 本発明は、野生型酵素のアミノ酸配列の243、250、および279位におけるシステインのうち少くとも一つが天然アミノ酸から選択される異なる残基で置換されてなるD - N - α - カルバミラーゼの変異体、D - N - α - カルバミラーゼの変異体のうち少くとも一つをコードするヌクレオチド配列を含んだ組換えプラスミド、そのプラスミドで形質転換された宿主微生物、および上記微生物の培養物によるこれら変異体の製造方法。

【効果】 D - N - α - カルバミラーゼの変異体は野生型酵素の場合より高い酵素安定性を有しており、製造収率で改善を示すD - α - アミノ酸の製造にとり特に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】野生型D-N- α -カルバミラーゼのアミノ酸配列の243、250、および279位におけるシステインアミノ酸残基のうち少くとも一つが天然アミノ酸の群から選択される異なる残基で置換されてなることを特徴とする、D-N- α -カルバミラーゼの安定な変異体。

【請求項2】天然アミノ酸残基がL-アラニンである、請求項1に記載のD-N- α -カルバミラーゼの変異体。

【請求項3】243および279位のシステインアミノ酸残基がアミノ酸残基L-アラニンで置換されてなる、請求項1に記載のD-N- α -カルバミラーゼの変異体。

【請求項4】請求項1に記載のD-N- α -カルバミラーゼの変異体をコードする、ヌクレオチド配列。

【請求項5】243、250、および279位におけるシステインのうち少くとも一つがアミノ酸残基L-アラニンで置換されたD-N- α -カルバミラーゼの変異体をコードする、請求項4に記載のヌクレオチド配列。

【請求項6】243および279位双方のシステインがアミノ酸残基L-アラニンで置換されたD-N- α -カルバミラーゼの変異体をコードする、請求項4に記載のヌクレオチド配列。

【請求項7】243、250、および279位におけるシステインアミノ酸残基のうち少くとも一つが天然アミノ酸の群から選択される異なる残基で置換されたD-N- α -カルバミラーゼの変異体をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、発現プラスミド。

【請求項8】ヌクレオチド配列が、243、250、および279位におけるシステインのうち少くとも一つがアミノ酸残基L-アラニンで置換されたD-N- α -カルバミラーゼの変異体をコードしている、請求項7に記載の発現プラスミド。

【請求項9】ヌクレオチド配列が、243および279位双方のシステインがアミノ酸残基L-アラニンで置換されたD-N- α -カルバミラーゼの変異体をコードしている、請求項8に記載の発現プラスミド。

【請求項10】D-ヒダントイナーゼ酵素をコードする遺伝子を含んでなる、請求項7～9のいずれか一項に記載の発現プラスミド。

【請求項11】Centraalbureau Voor Schimmelculturesに寄託され、寄託番号CBS 204.94を受けている、請求項9に記載のプラスミドpSM645。

【請求項12】243、250、および279位におけるシステインアミノ酸残基のうち少くとも一つが天然アミノ酸の群から選択される異なる残基で置換されたD-N- α -カルバミラーゼの変異体をコードするヌクレオチド配列を含んでなるプラスミドで形質転換された枯草菌および大腸菌の群から選択される微生物。

【請求項13】プラスミドが、243、250、および279位におけるシステインのうち少くとも一つがアミノ酸残基L-アラニンで置換されたD-N- α -カルバミラーゼの変異体をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、請求項12に記載の微生物。

【請求項14】プラスミドが、243および279位双方のシステインがアミノ酸残基L-アラニンで置換されたD-N- α -カルバミラーゼの変異体をコードするヌクレオチド配列を含んでなるものである、請求項12に記載の微生物。

【請求項15】プラスミドがD-ヒダントイナーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでなるものである、請求項12に記載の微生物。

【請求項16】大腸菌SMC305 CBS204.94である、請求項14に記載の微生物。

【請求項17】請求項7に記載のプラスミドで形質転換された大腸菌および枯草菌から選択される微生物の培養と、こうして得られた変異体の分離および精製が行われることを特徴とする、請求項1に記載のD-N- α -カルバミラーゼの変異体の製造方法。

【請求項18】プラスミドが、243、250、および279位におけるシステインのうち少くとも一つがアミノ酸残基L-アラニンで置換されたD-N- α -カルバミラーゼの変異体をコードするヌクレオチド配列を含んでなるものである、請求項17に記載の方法。

【請求項19】プラスミドが、243および279位双方のシステインがアミノ酸残基L-アラニンで置換されたD-N- α -カルバミラーゼの変異体をコードするヌクレオチド配列を含んでなるものである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】D-N-カルバミルアミノ酸または5-置換ヒダントインのラセミ混合物の立体特異性変換によるD- α -アミノ酸の製造方法であって、変換反応が、D-N- α -カルバミラーゼの変異体および/またはD-ヒダントイナーゼおよびD-N- α -カルバミラーゼの変異体からなる酵素系を生産できる微生物の存在下で行われることを特徴とする、方法。

【請求項21】変換反応がD-N- α -カルバミラーゼの変異体および/またはD-ヒダントイナーゼおよびD-N- α -カルバミラーゼの変異体からなる酵素系を生産できる微生物から単位された上記変異体および/または上記酵素系の存在下で行われる、請求項20に記載の方法。

【請求項22】D-N- α -カルバミラーゼの変異体および/またはその変異体を含んだ酵素系が不溶性固体支持体上に固定されてなる、請求項21に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、野生型酵素の場合と比較して改善された酵素安定性を有するD-N- α -カルバミラーゼの変異体、それらの製造手段および方法、およびD- α -アミノ酸の製造についてのそれらの使用に関する。

【0002】背景技術

酵素の工業的使用が限定されるのは、一般的にそれらの高い製造および精製コストのためだけではなく、知られているように、一連の因子、例えば熱変性、酸化現象と疎水性および/または共有タイプの結合に起因する凝集に基づくそれらの不安定性のためでもある。

【0003】したがって、酵素の不安定性の原因を突き止めることが、酵素方法を改善してそれをもっと有用なものにする解決策を見つける上で最も重要である。他方、(i) この不安定性の原因と、(ii) 酵素の活性を変えずに不安定性を解消または減少する上で可能な方策とを正確に示すことはしばしば困難性を伴う。

【0004】D-N- α -カルバミラーゼは、D-N-カルバミル- α -アミノ酸を立体特異性加水分解により、対応D- α -アミノ酸に変換することができる酵素である。これらの光学活性化合物は、薬理活性物質（例えば、D-フェニルグリシンおよびD-バラヒドロキシフェニルグリシンは、ペニシリン類およびセファロsporin類の合成に用いられる）、農薬（殺虫剤フルバニレート合成用のD-バリン）または甘味料（D-アラニン）の合成に重要な中間体である。

【0005】D-N- α -カルバミラーゼは、それが用いられる工業的方法の収率およびコストをかなり悪化させる不安定化現象もうけやすい。

【0006】

【発明の概要】上記技術の欠点を克服することが本発明の目的である。特に、本発明によると、野生型D-N- α -カルバミラーゼのシステイン243、250、および279のうち少なくとも一つの異なるアミノ酸残基による置換により、この酵素を安定化させることができ、D- α -アミノ酸の製造収率を改善することが見出された。これによれば、本発明の第一の態様は、243、250、および279位におけるシステインアミノ酸残基のうち少なくとも一つが天然アミノ酸の群から選択される異なるアミノ酸残基で置換されてなることを特徴とする、改善された酵素安定性を有したD-N- α -カルバミラーゼの変異体に関する。改善された安定性を有するD-N- α -カルバミラーゼの少なくとも一つの変異体をコードするヌクレオチド配列が、本発明のもう一つの対象である。本発明は上記配列を含んでなる複製性発現ベクターにも関する。本発明のもう一つの対象は、上記ベクターで形質転換された微生物に関する。適切な条件下で形質転換微生物を培養し、こうして得られた変異体を分離することからなる、改善された安定性を有するD-N- α -カルバミラーゼの少なくとも一つの変異体の製造方法が、本発明のもう一つの態様である。本発明は、D-

- α -アミノ酸の製造方法における、上記形質転換微生物または上記微生物から得られたD-N- α -カルバミラーゼの変異体の用途にも関する。

【0007】

【発明の具体的説明】本発明の他の目的は、下記記載および例から明らかである。特に、本発明によるD-N- α -カルバミラーゼの変異体は、野生型酵素のアミノ酸配列の243、250、または279位におけるシステイン残基(Cys)のうち少なくとも一つがL-アラニン、L-セリン、L-リジン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-アスパラギン、L-グルタミン、L-ヒスチジン、L-グリシン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリン、L-チロシン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-メチオニン、またはL-プロリンから選択される異なる残基で置換されていることを特徴とする。

【0008】本発明のD-N- α -カルバミラーゼの変異体は：

- a) D-N- α -カルバミラーゼをコードする遺伝子の特定部位に一以上の変異を導入し、
- b) 工程a) で得られた変異誘発させた遺伝子をクローニングベクターにクローニングし、
- c) 工程b) で得られた組換えベクターで宿主株を形質転換し、
- d) 工程c) で形質転換された宿主株を適切な培地で培養し、そして
- e) こうして得られたD-N- α -カルバミラーゼの変異体を分離および精製することからなる方法で製造される。

【0009】遺伝子の既定部位における変異の導入は、インビトロで公知変異誘発技術の1つを用いて実施できる。DNA配列上にある特定の既定部位で修正を行う様々な技術の中では、一本鎖の合成オリゴヌクレオチドを用いる技術が最も広く用いられている。

【0010】特に、Zoller, M. J. and Smith, M., (1982), Nucleic Acid Res., 10, 6487-6500に記載された方法の修正法が用いられ、その方法では：

- 1) D-N- α -カルバミラーゼまたはこの一部（標的配列）の遺伝子をM13タイプバクテリオファージまたはそれに由来するプラスミド中に導入して、変異遺伝子の合成用の鋳型として有用な一本鎖でそれを作り、
- 2) 変異を決定する内部部分を除いて変異誘発される配列に相補的なオリゴヌクレオチドを合成し、
- 3) 合成オリゴヌクレオチドを鋳型にアニーリングさせ（これは第二修飾鎖の合成用のプライマーとして作用する）、
- 4) インビトロで1回の重合および結合により二本鎖の環状構造（1本のフィラメントは親であり、他方は望ましい変異を含んでいる）を再構成し、

5) 親フィラメントを除去し、インビトロで1回の重合および結合により二本鎖の環状構造(双方のフィラメントが望ましい変異を含んでいる)を再構成し、

6) 変異および野生型クローンの集団を得ることによりコンピテント(competent)化された宿主細胞を形質転換するために二本鎖形を用い、

7) 変異クローンを選択する。

【0011】変異誘発されるD-N- α -カルバミラーゼの遺伝子に関して、これは微生物、例えば*Pseudomonas*、*Hansenula*、*Agrobacterium*、*Aerobacter*、*Aeromonas*、*Bacillus*、*Moraxella*、*Brevibacterium*、*Flavobacterium*、*Serratia*、*Micrococcus*、*Arthrobacter*、または*Paracoccus*から単離することができる。これら微生物の具体例としては*Bacillus macroides* ATCC 12905、*Aerobacter cloacae* IAM 1221、*Agrobacterium* sp. IP I-671、*Agrobacterium radiobacter* NRRLB 11291、*Pseudomonas* sp. FERM BP 1900 が挙げられる。

【0012】本発明の好ましい態様によれば、*Agrobacterium radiobacter* NRRLB 11291 に由来するD-N- α -カルバミラーゼ遺伝子が変異誘発された。D-N- α -カルバミラーゼ遺伝子を含むDNAの断片が制限酵素EcoRIおよびHindIII切断によりプラスミドpSM651(CBS203.94)から単離され、電気泳動ゲルによる精製後、それが同制限酵素で切断された後のバクテリオファージM13mp8に公知技術を用いて結合された。

【0013】得られたリガーゼ混合物はDagert, M. and Ehrlich(1979), *Gene*, 6:23に記載されたようにコンピテント化された*Escherichia coli* 71/18(大腸菌)の細胞を形質転換するために用いられ、形質転換株が多数の陽性組換えプラークを得るために適した培地上で選択された。

【0014】陽性プラークの1つから一本鎖を作った後、これは望ましい変異を導入するための鋳型として用いられた。特に、下記合成オリゴヌクレオチドがCys→Ala置換を243、250、および279位に導入するために用いられた:

(1) 5' GAG CAG CAT GGC CCC CTC CTC C3'

(2) 5' CGC CAC GAT GGC CGA ATG GCC3'

(3) 5' GCA GTT CCC GGG CGC GTT CGA GAT3'

【0015】オリゴヌクレオチドの合成は市販装置、例えばオリゴ1000 DNAシンセサイザー(Beckman)を用いて、公知方法で実施できる。

【0016】次いで、第二修飾フィラメントの合成用のプライマーとして作用する合成オリゴヌクレオチドへの一本鎖のカップリングが行われる。

【0017】望ましい変異を得た後、一方のフィラメン

トが親で、他方が望ましい変異を起こした標的配列の環状二本鎖構造が、インビトロで1回の重合および結合により再構成された。

【0018】親フィラメントはヘキソヌクレアーゼで除去され、その後環状二本鎖構造が再重合および結合により再構成される。この構造において、双方のフィラメントは変異を含んでいる。

【0019】上記反応混合物は、大腸菌TG1のコンピテント細胞を形質転換して、組換えバクテリオファージプラークを得るために用いた。各変異誘発実験から得られる陽性組換えプラークのゲノムに含まれたカルバミラーゼ遺伝子は、Sanger et al. (PNAS(1977), 74:5463)により記載された方法に基づき、市販キット Sequenase^R (USB)を用いて配列決定した。

【0020】本発明の変異体の活性および安定性の特徴を確かめるために、上記のように変異誘発された遺伝子を含むプラスミドで形質転換された大腸菌細胞が、適切な培地中37℃で16時間培養された。次いで細胞溶解物から得られたタンパク質抽出物が、SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウムを含有したポリアクリルアミドゲル上の電気泳動)および光学密度計測分析により分析された。結果は、変異体が互いに匹敵して、野生型酵素の発現レベルに類似した量で発現されることを示した。

【0021】Weatherburn, M. W., (1967); (*Anal. Chem.*, 39:971)に記載されたように生抽出物で行われた活性試験では、すべての変異体について野生型酵素の場合に匹敵する活性を示した。

【0022】異なる時間に室温(20~25℃)で行われた安定性研究では、試験された変異体について野生型D-N- α -カルバミラーゼの場合よりも高い安定性を示した(例9および図1)。

【0023】事実、888時間後に野生型酵素はその活性を完全に喪失したが、二重変異体Cys243Ala-Cys279Alaの場合は63%の残留活性が観察され、1896時間後に32%であった。

【0024】加えて、D-N-カルバミル-パラヒドロキシフェニルグリシンを同量の変異酵素Cys243Ala-Cys279Alaおよび野生型酵素と接触させることにより行われた研究では、同反応時間で、変異酵素がD-パラヒドロキシフェニルグリシンの製造収率で改善を示すことを示した(例10および図2)。

【0025】本発明によれば、上記のように変異誘発された遺伝子は、宿主株でその発現を調節する配列のコントロール下にその遺伝子を正確に配置することにより、クローニングベクター中に導入できる。

【0026】目的に適したベクターは、市場または公的な貯蔵センターで入手しうるプラスミド、バクテリオファージ、およびコスミドから選択することができる。

【0027】本発明の好ましい態様によれば、変異誘発

されたカルバミラーゼ遺伝子はD-ヒダントイナーゼ酵素をコードする遺伝子を含んだプラスミド例えばpSM651 (CBS203.94) 中にクローニングされる。

【0028】特に、ヒダントイナーゼおよび野生型カルバミラーゼ遺伝子 (ヒダントイナーゼ-カルバミラーゼオペロン) をベクターpSM671 (CBS205.94) 中に挿入することで得られた上記プラスミドは、それが大腸菌および/または枯草菌中でコントロール下におかれた遺伝子の発現をかなり効率的にインダクターなしで指示できる合成プロモーターを含んでいることで特徴付けられる。

【0029】同様の変異誘発された遺伝子による野生型D-N- α -カルバミラーゼをコードする遺伝子の置換から、D-ヒダントイナーゼ酵素およびD-N- α -カルバミラーゼの変異体からなる酵素系を発現できる組換えプラスミドを組立てる。

【0030】変異誘発されたD-N- α -カルバミラーゼ遺伝子または変異誘発されたヒダントイナーゼ-カルバミラーゼオペロンを含む組換えプラスミドは枯草菌および/または大腸菌の群から選択される宿主微生物中に導入することができる。

【0031】次いで、これらの微生物は炭素および窒素の同化源と、異なるカチオン、アニオンおよび、場合により微量のビタミン、例えばビオチンまたはチアミン、あるいはアミノ酸を含有した水性培地中、好気的条件下で培養される。

【0032】同化性炭素源には炭水化物、例えばグルコース、加水分解アミド、糖蜜、スクロースまたは他の慣用的な炭素源がある。

【0033】窒素源の例は、例えば無機アンモニウム塩、例えば硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムまたは炭酸アンモニウムと、尿素または有機もしくは無機窒素含有物質、例えばペプトン、酵母または肉エキスから選択することができる。

【0034】下記カチオンおよびアニオン、即ちカリウム、ナトリウム、マグネシウム、鉄、カルシウム、酸のリン酸、硫酸、塩化物、マンガンおよび硝酸イオンが本発明の目的にとり同等に適している。

【0035】発酵は25~40℃、好ましくは30~37℃の温度、6~7.5、好ましくは6.5~7.0のpHにおいて、攪拌下で行われる。

【0036】慣用的技術、例えば遠心または濾過で培地から回収された細胞 (バイオマス) はD- α -アミノ酸の製造に用いられ、または細胞がヒダントイナーゼおよび変異カルバミラーゼ酵素を発現するときには、5-置換ヒダントインのラセミ混合物の製造に用いられる。

【0037】一方、D- α -アミノ酸の製造においては、超音波処理またはFrench-Pressによる細胞の破壊から得られた細胞抽出物、慣用的技術を用いて精製または

部分精製された双方の酵素、あるいは不溶性支持体に固定された酵素が使用できる。

【0038】多数のD-N-カルバミルアミノ酸および5位で置換されたヒダントインが本発明の目的に使用できる。5位で可能な置換基は炭素原子数1~6の直鎖または分岐鎖アルキル基から選択されるが、そのアルキル基はヒドロキシル、カルボキシル、スルフヒドリルもしくはアミノ基またはフェニルもしくはベンジル基で一または多置換でき、更に後者の置換基はオルト、メタおよびパラ位に1以上の置換基を含むことができる。

【0039】5-置換ヒダントインの例としては、D、L-5-フェニルヒダントイン、D、L-5-パラヒドロキシフェニルヒダントイン、D、L-5-メトキシヒダントイン、D、L-5-イソプロピルヒダントイン、D、L-5-チエニルヒダントイン、D、L-5-パラメトキシフェニルヒダントイン、D、L-5-パラクロフェニルヒダントイン、D、L-5-ベンジルヒダントインが挙げられる。

【0040】対応D- α -アミノ酸における出発基質 (5-置換ヒダントインまたはD-N-カルバミルアミノ酸) の変換反応は、密封容器中、窒素雰囲気下において、20~60℃、好ましくは30~45℃の温度で行われることが好ましい。反応培地のpHは6~10、好ましくは7~8.5の値内に維持される。このpH調節は、例えば塩基性水溶液、例えばアンモニア、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウムまたはカリウムの水溶液を加えることにより実施できる。

【0041】基質の初期濃度は通常2~30重量%である。

【0042】反応混合液に加えられるバイオマスまたは酵素の量は、酵素に対する基質の具体的親和性に依存している。1/1~1/50のバイオマス/基質重量比が通常使用できる。

【0043】本発明の方法で製造されたD- α -アミノ酸は、従来よりの方法、例えばイオン交換クロマトグラフィーまたはアミノ酸の等電点沈降を用いて反応環境から回収することができる。

【0044】本発明はA. radiobacter のD-N- α -カルバミラーゼの変異体の製造に関するが、他の微生物から得られる相同的酵素の修正にも適用しうことは明らかである。

【0045】本発明によれば、プラスミドpSM645は大腸菌SMC306としてCentraalbureau Voor Schimmelcultures, SK Baarn (Holland) に受託され、そこで寄託番号CBS204.94が付された。

【0046】

【実施例】下記実験例は本発明を更に説明するが、その範囲を制限するものではない。

例1

バクテリオファージM13mp8の複製形におけるD-

N - カルバミラーゼをコードする遺伝子の断片 EcoRI - HindIII のクローニング: プラスミド pSM651 CBS203.94 (1 μg) を 37℃ で 60 分間かけて 1 単位の制限酵素 EcoRI および HindIII (Boehringer) により切断した。

【0047】酵素反応を 65℃ で 10 分間阻止した後、反応混合物を低融点アガロースゲル上に 0.8% で置き、50 ボルトで 2 時間処理した。次いで D - N - α - カルバミラーゼをコードする配列を含んだ 915 塩基対 (bp) の EcoRI - HindIII バンドを Gelase™ (Epicentre Technologies) により精製した。

【0048】このバンドに相当する DNA 断片 (0.02 μg) を、同制限酵素で切断した後のベクター M13mp8 (50 ng) に結合させた。リガーゼ反応は 66 mM トリス HCl pH7.6、1 mM ATP、10 mM MgCl₂、10 mM ジチオスレイトール (DTT) 含有混合液 20 μl 中 T4 DNA リガーゼ 1 U の存在下 16℃ で 16 時間行った。

【0049】次いでリガーゼ混合液の一部 (5 μl) を用いて、50 mM CaCl₂ でコンピテント化された大腸菌 71/18 (BRL) の細胞を形質転換させた (Dagert, M. and Ehrlich (1979), Gene, 6:23)。

【0050】次いで形質転換株を 40 μg/ml の X - Gal (5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - D - チオガラクトピラノシド) および 125 μg/ml の IPTG (イソプロピル - β - D - チオガラクトピラノシド) 含有の YT 寒天 (8g/l バクトトリプトン (DIFCO)、5g/l NaCl) のプレート上で選択した。

【0051】上記のように操作して、多数の陽性組換えブランク (白色) を得たが、これは非組換え体 (青色) と容易に区別することができた。

【0052】EcoRI - HindIII 断片の挿入が正確に行われたかを確認するために、二本鎖バクテリオファージ DNA (複製形または RF) をいくつかの陽性ブランクから単離し、EcoRI および HindIII 酵素 (Boehringer) で切断した。

【0053】部位特定変異誘発段階で鋳型として用いられる一本鎖バクテリオファージ DNA (SS) を陽性ブランクの 1 つから作ったが、これは正確な挿入を示した。

【0054】例 2

部位特定変異誘発

望ましい変異を導入するために用いられたオリゴヌクレオチドは、オリゴ 1000 DNA シンセサイザー (Beckman) を用いて、公知方法により合成した。特に、そのオリゴヌクレオチドは下記配列を有している：

(1) 5' GAG CAG CAT GGC CCC CTC CTC 3'

変異 Cys 243 → Ala を挿入する；

(2) 5' CGC CAC GAT GGC CGA A

TG GCC 3'

変異 Cys 250 → Ala を挿入する；

(3) 5' GCA GTT CCC GGG CGC GGT CGA GAT 3'

変異 Cys 279 → Ala を挿入する。

【0055】下線の塩基はシステインのコドンアラニンのコドンで置換するために用いられる塩基である。

【0056】オリゴヌクレオチドは、100 mM トリス HCl pH8、10 mM MgCl₂、5 mM DTT、1 mM ATP および T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (Promega) 2 U 含有の反応混合液 30 μl 中 37℃ で 30 分間のインキュベートにより、鎖の 5' 末端側でリン酸化させた。

【0057】次いでリン酸化オリゴヌクレオチドは、製造者の指示に従い操作するため、Zoller and Smith (1983, Methods in Enzymol., 100:468-500) に記載された方法に基づき、系“オリゴヌクレオチド - 特定部位インビトロ変異誘発バージョン 2” (Amersham) を用いて、インビトロで 3 種の変異誘発反応に別々に用いた。

【0058】次いで反応混合物は前記のように大腸菌 T G1 (Amersham) の細胞を感染させるために用いた。

【0059】各変異誘発実験から得られる白色ブランクに由来するバクテリオファージ DNA は、望ましい変異の存在を確認するために、Sanger et al. (PNAS (1977), 74:5463) に記載された方法に基づき“Sequenase 2.0” キット (United States Biochemical) で配列決定した。

【0060】例 3

プラスミド pSM671 における変異体 Cys → Ala のサブクローニング

システインからアラニンへの置換を含んだ組換えバクテリオファージの二本鎖 DNA の各々 1.0 μg を制限酵素 EcoRI および HindIII (2 U) で切断し、その後同制限酵素で既に切断されたプラスミド pSM671 CBS205.94 (1 μg) と結合させた。リガーゼ反応は T4 DNA リガーゼ 2 U、バクテリオファージ DNA 150 ng およびプラスミド DNA 50 ng を含有したリガーゼ緩衝液 20 μl 中 16℃ で 16 時間行った。

【0061】次いで各混合液 5 μl を用いて、大腸菌 71/18 (BRL) のコンピテント細胞を形質転換させた。

【0062】形質転換株は μg/ml のクロラムフェニコールを含有した LB 寒天培地 (0.8% バクトトリプトン、0.5% 酵母エキスを、0.5% NaCl、寒天 18g/l) のプレート上で選択した。

【0063】こうして得られた陽性 Cm^r クローン (クロラムフェニコール耐性) の 1 つから単離されたプラスミド DNA を、遺伝子の正確な挿入を確認するために、制限分析により分析した。

【0064】こうして得られたプラスミドを pSM641 (変異 Cys 243 → Ala を有する)、pSM64

2 (変異Cys 250→Alaを有する)、pSM643 (変異Cys 279→Alaを有する)と呼んだ。

【0065】例4

大腸菌における変異体の発現

プラスミドpSM641、pSM642、およびpSM643を保有する大腸菌株を、20 µg/mlのクロラムフェニコールが加えられたLB培地10mlを含有した各々の50mlフラスコ中に接種し、攪拌下(200rpm)37℃で16時間インキュベートした。コントロールとして、カルバミラーゼの野生型遺伝子を保有するプラスミドpSM637を含んだ大腸菌71/18の株を上記と同様の条件下で培養した。

【0066】次いで培養液を12000rpmで1分間遠心した(ローターSJ14、Beckman)。こうして得られた細胞を20mMトリスHCl pH7.5、20mM MeOH、20%グリセロールの緩衝液300 µlに再懸濁し、超音波処理(Soniprep150、平均電圧でMSE1分間インパルス)により溶解させた。各溶解物20 µlをSDS-PAGE及び活性試験により分析した。

【0067】電気泳動分析では、すべての酵素が互いにおよび野生型酵素の発現レベルに匹敵する量で発現された。

【0068】例5

二重Cys→Ala変異体の組立て

例2で記載された部位特異性変異誘発方法を用いて、二重変異Cys 243Ala - Cys 250AlaおよびCys 243Ala - Cys 279Alaを含んだ変異体を得た。処置は、導入される変異を含んだ2つのオリゴヌクレオチド(各々、変異体Cys 243Ala - Cys 250Alaについてオリゴヌクレオチド1および2、変異体Cys 243Ala - Cys 279Alaについてオリゴヌクレオチド1および3)が同時に加えられた2種の反応混合液を調製することだけであった。インビトロ変異誘発反応後、各混合液は大腸菌TG1の細胞を形質転換するために用いた。各形質転換から得られる白色プラークの1つから単離されたプラスミドDNAは、システインの正確な置換を確認するために配列決定した。次いで選択された組換えバクテリオファージを二本鎖DNAの作成のために用いた。

【0069】例6

プラスミドpSM671における二重変異体のサブクロニング

例3で記載されたのと同様の操作を用いて、2つの変異を含むカルバミラーゼ遺伝子をプラスミドpSM671

CBS205.94でバクテリオファージDNAからサブクロニングした。得られたプラスミドの分析では、カルバミラーゼ遺伝子の正確な挿入を示した。得られたプラスミドはpSM644(二重変異Cys 243Ala - Cys 250Alaを有する)およびpSM645(二重変異Cys 243Ala - Cys 279Ala

aを有する)と呼んだ。プラスミドpSM645を含む大腸菌のクローンは略称SMC306で示した。

【0070】例7

大腸菌における二重変異体の発現

プラスミドpSM644およびpSM645を含んだ大腸菌の細胞を例4に記載されたのと同条件下で培養した。細胞溶解物の電気泳動分析では、変異酵素が野生型酵素の場合に匹敵するレベルで発現されることを示した。

【0071】例8

変異体の精製

プラスミドpSM641、pSM645およびpSM637(コントロール)を各々含んだ大腸菌の株の発酵から得たバイオマスを25mMトリスHCl pH7.0、20%(v/v)グリセロールの緩衝液(緩衝液A)に懸濁し、French-Pressで2回18000psi(約1260 kg/cm²)で溶解させた。

【0072】溶解物の遠心(30000rpm、4℃、30分間)後に得られた上澄を緩衝液Aで平衡化されたSepharose[®] Q FF(Pharmacia)カラム(2.6×20cm)上にのせた。次いでカラムを緩衝液A(カラムの3倍容量)で洗浄し、その後0~0.4MのNaCl勾配で溶出させた。酵素活性を有する分画を集め、塩化ニッケルで活性化されて緩衝液Aで平衡化されたFast Flow Chelating Sepharose[®](Pharmacia)カラム(2.6×20cm)上にのせた。

【0073】緩衝液Aでカラムを洗浄した後、それを同緩衝液中0~0.2Mのイミダゾールの勾配で溶出させた。酵素活性を有する分画を集めて、YM10膜(Amicon)で限外濾過により濃縮した。次いで濃縮溶液を緩衝液Aで平衡化させたSuperose[®] 12HR10/30(Pharmacia)カラム上にのせ、同緩衝液で溶出させた。酵素活性を有する分画をSDS-PAGEにより12.5%で分析したところ、分子量約36000ドルトンで純度90%以上のタンパク質の存在を示した。

【0074】0.2M NaPO₄ pH7.0の緩衝液中基質として0.12M D-カルバミルパラヒドロキシフェニルグリシンを用いて測定された精製タンパク質の比活性は互いに匹敵し、野生型酵素の場合と類似する値8~9U/mgであった。

【0075】単位という用語は、40℃で1分間かけて1 µモルの基質を形質転換できる酵素の量に関する。

【0076】例9

変異体の酵素安定性の分析

例8に記載されたように得られた酵素溶液を0.2 µmのDynaGard(Microgon, Inc.)で無菌条件下濾過した。次いで濾液の一部(0.2ml)をEppendorf 無菌試験管に入れ、室温(20~25℃)で維持した。規則的な時間間隔で、残留酵素活性はpH7.0の0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液中でD-N-カルバミルパラヒドロキシ

フェニルグリシンを基質として用いてHPLCで形成されたD-パラヒドロキシフェニルグリシンを計量することにより40℃で調べた。

【0077】表1および図1は、hr（横座標）で表示された時間に対して、野生型カルバミラーゼ（－・

－）、変異体Cys243Ala（－＋－）およびCys243Ala-Cys279Ala（－＊－）の残留活性（縦座標）がパーセンテージで示されている。

【0078】

【表1】

表1

残留酵素活性 (%)

時間(hr)	WT	Cys243Ala	Cys243Ala-Cys279Ala
0	100	100	100
188	55	70	91
480	18	38	70
888	0	5	63
1056	0	1	58
1896	0	0	32

【0079】例10

野生型カルバミラーゼおよび変異体Cys243Ala-Cys279Ala間の生産力の比較

同量（0.064単位/ml）の野生型カルバミラーゼおよび変異カルバミラーゼCys243Ala-Cys279Alaを、pH7.0の0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液100ml中にD-N-カルバミルパラヒドロキシフェニルグリシン（25.2mg/ml）を含有した40℃にサーモスタット調節される2つの装置に導入した。規則的な時間間隔で、生産されたD-パラヒドロキシフェニルグリシンの量をHPLCにより調べた。得られた結果は図2で示される通りであった。そこでは横座標はhrの時間であり、縦座標はμmol/mlとして表示されたア

配列

GAGCAGCATG GCCCCCTCCT CC

【0081】配列番号：2

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CGCCACGATG GCCGAATGGC C

【0082】配列番号：3

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GCAGTCCCG GCGCGGTCG AGAT

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による変異体の酸素安定性の分析結果を示す図面である。ここで、野生型カルバミラーゼ（－・－）、変異体Cys243Ala（－＋－）およびCys243Ala-Cys279Ala（－＊－）の残留活性（縦座標）がパーセンテージで示されている。

ミノ酸の量である。（－・－）は野生型カルバミラーゼを、（－＋－）はカルバミラーゼの変異体をそれぞれ表す。

【0080】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：プライマー

22

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：プライマー

21

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

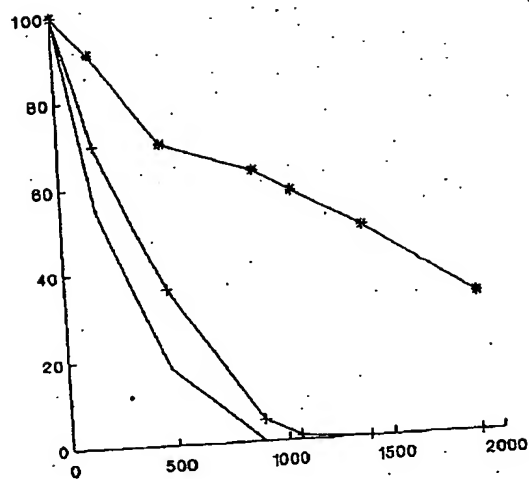
配列の特徴：

特徴を表す記号：プライマー

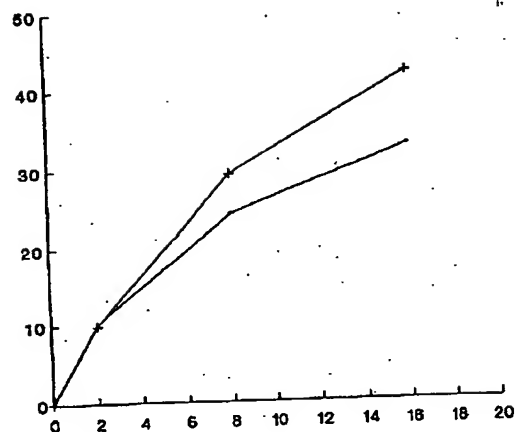
24

【図2】野生型カルバミラーゼおよび変異体Cys243Ala-Cys279Ala間の生産力の比較を示す図面である。ここで、（－・－）は野生型カルバミラーゼを、（－＋－）はカルバミラーゼの変異体をそれぞれ表す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. 6

C 1 2 N 1/21

15/09

識別記号

Z N A

庁内整理番号

8828-4B

F I

技術表示箇所

//(C 1 2 N 9/14

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:01)

C 1 2 R 1:01)

(72)発明者 グイド、グランディ

イタリア国セグラータ、ノナ、ストラー

ダ、4